

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PARASITOLOGY

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA PARAZITOLOGIE

Ph.D. study program: Parasitology
Doktorský studijní program: Parazitologie



**Development of *Leishmania* from *L. donovani* complex
in various vectors**

**Vývoj leishmanií z komplexu *L. donovani* v různých
přenašečích**

Mgr. Veronika HROBÁRIKOVÁ (roz. ŠEBLOVÁ)

Summary of the Ph.D. Thesis / Autoreferát dizertační práce

Supervisor / Školitel: Prof. RNDr. Petr VOLF, CSc.

Prague, 2013

Contents

English version

ABSTRACT	2
1 INTRODUCTION	3
2 OBJECTIVES OF THE THESIS	5
3 USED METHODS	5
4 LIST OF PUBLICATIONS	6
5 SUMMARY AND CONCLUSIONS	7

Czech version

ABSTRAKT	11
1 ÚVOD	12
2 CÍLE PRÁCE	14
3 METODIKA	14
4 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ	15
5 SHRNUÍ	16
REFERENCES	18
 CURRICULUM VITAE	 21

Abstract

This thesis focuses on the development of protozoan parasites from *Leishmania donovani* complex in their insect vectors and summarizes results of five parts of the project I participated in during my Ph.D. studies.

Sand flies of genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia* are the only proven vectors of leishmaniasis, however, the role of alternative vectors, like ticks, fleas and biting midges is frequently discussed in the literature. In this work, we showed that Eurasian species of biting midge *Culicoides nubeculosus* does not support late stage infections of *L. major* and *L. infantum*. We also demonstrated that microscopical observation of *Leishmania* promastigotes in the digestive tract of bloodfeeding arthropods remains a crucial method for any conclusion about the vector competence of the suspected insect.

In the second part of our study were compared the life-cycle parameters and vector competence of two Ethiopian *P. orientalis* colonies for *L. donovani*. Marked differences between colonies were found in life-cycle parameters, however, molecular analyses did not reveal any genetic differences. Experimental infections showed that both *P. orientalis* colonies are very susceptible to *L. donovani* infection and even the lowest infective dose tested (2×10^3 promastigotes/ml; corresponding to 1–2 promastigotes) was sufficient to establish *L. donovani* infection in about 50% of females.

Furthermore, we demonstrated that three *Leishmania* species tested, *L. major*, *L. infantum* and *L. donovani*, are not able to produce late-stage infections in *Sergentomyia schwetzi*, which is considered as a potential vector of human leishmaniasis in some areas. We observed that crucial parameter for complete development of *Leishmania* in *S. schwetzi* seems to be the short period between degradation of peritrophic matrix (PM) and defecation. The persistence of PM till the end of digestion leads to expulsion of parasites from the sand fly midgut together with bloodmeal remnants.

Finding of accurate natural infective dose is crucial for development of the ideal experimental model of visceral leishmaniasis. Therefore, we quantified number of transmitted dermatotropic and viscerotropic *L. infantum* parasites delivered to the mouse skin by individual sand flies, *P. perniciosus* and *L. longipalpis*, during feeding. From total number of biting females, 15% to 65% of them inoculated promastigotes to the mouse skin and the parasite number transmitted by individual sand flies was very heterogenous, ranging from 4 up to 4.2×10^4 promastigotes. Surprisingly, in both sand fly species the parasite load transmitted was higher for the strain with dermal tropism; 29% of *L. longipalpis* and 14% of *P. perniciosus* transmitted more than 1000 parasites.

Finally, we explored the role of *L. infantum* nicotinamidase enzyme (PNC1) during intravectorial development. We showed that the null *L. infantum* mutants in PNC1 gene are not able to establish the late stage infection in *P. perniciosus* and our data indicate that the nicotinamidase enzyme is essential for the completion of the *L. infantum* development in the sand flies.

1 Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) belongs to the most important protozoan diseases caused by members of genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *L. donovani* complex and transmitted by phlebotomine sand flies. One of the most affected areas are located in East Africa in Ethiopia with an estimated 4500 to 5000 new cases every year. VL is associated with high mortality and morbidity in this country, and is worsened by malnutrition, isolated location of VL endemic areas, unavailability of treatment and medicine, presence of resistant strains and co-infections with HIV (reviewed by Cruz et al., 2006; Alvar et al., 2008). The principal vector of VL is *Phlebotomus orientalis* (Gebre-Michael et al., 2007), however, some authors hypothesized about the role of *Sergentomyia* spp., especially in VL foci where *P. orientalis* is less abundant or absent (Hoogstraal and Heyneman, 1969).

The detailed studying of vector competence of sand fly vectors and other suspected bloodfeeding arthropods, like fleas, ticks (Coutinho and Linardi, 2007; Ferreira et al., 2009; Paz et al., 2010; Colombo et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2012) and biting midges (Dougall et al., 2011), is necessary prerequisite for understanding of natural transmission cycles in endemic areas. To complete the full life cycle in vectors, *Leishmania* must overcome serial critical steps in the host environment of the sand fly gut (reviewed by Sacks and Kamhawi, 2001), like the attack of proteolytic enzymes (Dillon and Lane, 1993), the escape from peritrophic matrix and the attachment to midgut epithelium to avoid expulsion from the midgut with bloodmeal remnants (reviewed by Bates, 2008). The perspective of control is still highly dependent on those research progress and knowledge of vector competence is fundamental for understanding of epidemiology of leishmaniasis. Likewise, collection, colonization and maintenance of sand flies colonies originating from endemic areas brings a unique opportunity to study these aspects of vector biology (Volf and Volfova, 2011).

Furthermore, during the developmental life cycle *Leishmania* must adapt to various environments that differ in available nutritional resources. It was reported, that *Leishmania* is NAD⁺ auxotroph organism reliant on external precursors, such as nicotinic acid (Nac) and nicotinamide (NAm) in biosynthesis of NAD⁺ (Bieganowski and Brenner, 2004). NAm is converted into Nac by a nicotinamidase enzyme, which is present in lower organisms, such as bacteria or yeast, but is absent in mammals. This enzyme controls the major part of NAD⁺ production, parasite growth and pathogenesis (Purser et al., 2003; Kim et al., 2004; Ma et al., 2009) by different pathogens including *Leishmania* (Gazanion et al., 2011). These properties of nicotinamidase and fact that this enzyme is absent in mammals makes from nicotinamidase a promised potential drug target (Michels and Avilán, 2011). Nothing is known about the role of *Leishmania* nicotinamidase during the intravectorial development.

Different approaches finding the ideal VL leishmaniasis model to test novel therapeutics and immunoprophylaxis candidates quantified the parasite numbers (Warburg and Schlein, 1986; Rogers et al., 2004, 2010; Kimblin et al., 2008; Secundino et al., 2012) and tested different route of inoculation (reviewed by Garg and Dube, 2006). However,

it is not clear how well these experiments mimic natural transmission. During the feeding of infected sand flies into the host skin delivered pharmacologically active saliva (reviewed by Rohousová and Volf, 2006) and promastigote secretory gel (Rogers et al., 2002), which both enhance the development of *Leishmania* infection. Additionally, a determination of infective dose delivered to the host skin by single sand fly during feeding is one of the crucial aspects for development of an accurate VL experimental model.

2 Objectives of the thesis

The Ph.D. thesis is focused on various aspects of interaction between parasites of *L. donovani* complex and their vectors. I tested the susceptibility of various sand fly species and biting midges to *Leishmania* infection and determined the accurate number of *L. infantum* parasites delivered to the host skin during the bite. I also investigated the importance of nicotinamidase activity for the intravectorial development of *Leishmania*.

The main objectives of this thesis were:

- to determine the transmission rate and quantify the number of promastigotes transmitted into the mouse skin by individual *P. perniciosus* and *L. longipalpis* sand fly females and compare differences in transmission parameters between dermatropic and viscerotropic strain
- to describe potential differences in life-cycles parameters of two *P. orientalis* colonies originating from Ethiopia and test their susceptibility to *L. donovani* infection and study the effect of initial infective dose on *Leishmania* development in these vectors
- to study susceptibility of *Sergentomyia schwetzi* to different *Leishmania* species
- to test the susceptibility of biting midges *Culicoides nubeculosus* to various *Leishmania* including *L. infantum*
- to investigate the role of enzyme nicotinamidase of *L. infantum* in development in its natural vector *P. perniciosus*

3 Used methods

Used methods are described in details in original publications and can be listed as follows:

- methods commonly used for colonization and maintenance of sand flies colonies (reviewed in Volf and Volfova, 2011)
- cultivation of *Leishmania* parasites and experimental feeding
- light microscopy
- Q-PCR using SYBR Green fluorescent probe
- RAPD PCR and phylogenetic analyses
- DNA sequencing

4 List of publications

1. Maia C, **Seblova V**, Sadlova J, Votypka J, Volf P. (2011). Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(6): e1181. PMID: 21695108
2. **Seblova V**, Volfova V, Dvorak V, Pruzinova K, Votypka J, Kassahun A, Gebre-Michael T, Hailu A, Warburg A, Volf P. (2013). *Phlebotomus orientalis* sand flies from two distant Ethiopian localities and their susceptibility to *L. donovani*. Manuscript submitted to *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
3. Sadlova J, Dvorak V, **Seblova V**, Warburg A, Votypka J, Volf P. (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to human. Manuscript submitted to *Parasites & Vectors*.
4. **Seblova V**, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. (2012). Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *Journal of Medical Entomology* 49(5): 967–970. PMID: 23025175
5. Gazanion E, **Seblova V**, Votypka J, Vergnes B, Garcia D, Volf P, Sereno D. (2012). *Leishmania infantum* nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus*. *International Journal of Parasitology* 42(4): 323–7. PMID: 22619752

5 Summary and conclusions

This thesis sumps up published results of project I participated in during my Ph.D. studies. The project was focused on various aspects of *L. donovani* complex interaction with their vectors. The emphasis was put on transmission parameters, vector competence of different sand flies species and biting midges. Furthermore, was investigated the importance of *L. infantum* nicotinamidase enzyme during the intravectorial development.

- The first part of this thesis was focused on transmission parameters of two sand flies species, *P. perniciosus* and *L. longipalpis*, infected by viscerotropic or dermatotropic *L. infantum* strain. We observed that the *L. infantum* strains developed very well producing heavy infection including colonization of stomodeal valve in most females of both species. Q-PCR showed that number of transmitted parasites was very heterogenous ranging from 4 up to 4.2×10^4 promastigotes per bite and 15–65% of infected females transmitted the promastigotes to the host skin depending on sand fly-*Leishmania* combination. Interestingly, in both sand fly species the parasite load transmitted was higher in females infected by dermatotropic strain where 29% of *L. longipalpis* and 14% of *P. perniciosus* transmitted more than 1000 parasites. On the contrary, sand flies infected by viscerotropic strain transmitted less than 600 promastigotes. The significant variation in inoculum size between females infected by dermatotropic and viscerotropic strain allow us to hypothesize that infectious dose delivered to host skin could be one of the important factor determining infection outcome and tropism of *Leishmania* strain.
- In the second study, we determined the life cycle parameters, genetic differences and susceptibility of two Ethiopian *P. orientalis* colonies originating from a non-endemic site in lowlands – Melka Werer (MW), and an endemic focus of VL in the highlands – Addis Zemen (AZ) to *L. donovani*. During colonization was shown that both colonies prefer relative high humidity and the critical factor affecting larval development was the quality of larval food. Autoclaved food led to delayed non-synchronized development with tendency of the L4 larvae to diapause. Despite obvious differences were found in certain life-cycle parameters, we demonstrated using RAPD PCR and DNA sequencing of cytB and COI mitochondrial genes that both colonies are genetically identical. Subsequently, the cross-mating study between MW male/AZ female and AZ male/MW female was done showing that hybrids from F1 and F2 developed very successfully and had higher fecundity than parental colonies. In our study, both tested strains of *L. donovani* developed very well in *P. orientalis* females and colonized anterior parts of the midgut and the stomodeal valve. Parasite development was relatively fast at 26 °C as the presence of metacyclic promastigotes and colonization of stomodeal valve by haptomonads was observed already on day 5 post-bloodmeal (PBM). On day 10 PBM, the infection rates in both colonies were

very high (93% in MW and 81% in AZ) and the Q-PCR revealed that females from both colonies did not differ in total numbers of parasites in their midguts. Surprisingly, experimental infections revealed that even the lowest infective dose tested (2×10^3 *L. donovani* promastigotes/ml of blood), was sufficient to establish the late stage infection in about 50% of females. In line with our results, we can conclude that non-endemicity of visceral leishmaniases in Melka Werer area can not be explained by low susceptibility of local *P. orientalis* to *L. donovani*.

- Furthermore, we tested susceptibility of *Sergentomyia schwetzi* originating from Sheraro in the north-western Ethiopia to three *Leishmania* species, *L. major*, *L. infantum* and *L. donovani*. During early phase of infection, when parasites were still enclosed inside the endoperitrophic space, infection rate of all tested *Leishmania* species was very high (>90%) and comparable with those reached in control vectors, i.e. *L. longipalpis* and *P. duboscqi* with *L. infantum* and *L. major*, respectively. However, infection rates and intensity of infection *L. donovani* in *S. schwetzi* rapidly decreased to 28% by day 3 PBM, 19% by day 4 PBM and 1.4% by day 9 PBM. The same decreasing trend was observed in females infected by *L. infantum* and *L. donovani*. Only in single female was observed *L. donovani* promastigotes in the abdominal midgut and no females infected by *L. infantum* and *L. major* survive till day 10 PBM. We showed that for development of human *Leishmania* in *S. schwetzi* seems to be a crucial parameter the period between the degradation of the peritrophic matrix (PM) and defecation. In *S. schwetzi*, the degradation of the PM is delayed often till defecation and promastigotes have no chance to leave endoperitrophic space what leads to defecation of parasites with bloodmeal remnants. As we never found heavy infection with colonization of stomodeal valve in *S. schwetzi* we conclude that this species cannot serve as the vector of *L. donovani* in the VL foci of the northern Ethiopia.
- We also tested susceptibility of biting midges *Culicoides nubeculosus* to two major zoonotic species of *Leishmania* infecting humans in the Old World, *L. major* and *L. infantum*. *Leishmania major* grew rapidly in the *C. nubeculosus* midgut until day 2–3 when midges defecated, whereupon infections were completely lost. Similarly, by day 3 PBM, most of the females had defecated and midgut infections rates were very low. In 17% females only light infection with long nectomonads was observed in the abdominal midgut. On days 7 and 10 PBM no parasites were detected in 70 examined females. We showed that *Leishmania* is not able to undergo complete life cycle in *C. nubeculosus*. Promastigotes of both parasite species, *L. infantum* and *L. major*, were able to escape from PM but did not attach to midgut epithelium and were defecated. Therefore, we suggest that the lack of midgut attachment is the major refractory barrier for *Leishmania* in *Culicoides* midges. However, the PCR detected parasite infection up to and including 7 days PBM despite microscopical examination recorded any viable promastigotes in tested midges. The PCR probably amplified *Leishmania* DNA from dead promastigotes. This illustrates that PCR positivity,

especially if non-quantified, can be misleading in implication of arthropods as vectors of *Leishmania*.

- Within the study of various factors affecting *Leishmania* development, we investigated the importance of *L. infantum* nicotinamidase enzyme. We demonstrated that deletion of gene for nicotinamidase leads to inability of null mutants to establish the late stage infection inside midgut of *P. perniciosus* and our results indicate that nicotinamide (NAm) and nicotinamidase might be a very important nutritional factors essential for completing of *Leishmania* development inside sand flies.

CZECH VERSION

Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem parazitických prvků z komplexu *Leishmania donovani* v jejich hmyzích přenašečích a shrnuje výsledky pěti částí mého doktorského projektu.

Jedinými potvrzenými přenašeči leishmaniózy jsou dva rody flebotomů, *Phlebotomus* a *Lutzomyia*, i když otázka alternativních přenašečů jako jsou klíšťata, blechy a tiplíci, je v současnosti v literatuře velmi intenzivně diskutována. V této práci jsme prokázali, že v eurasijském druhu tiplíka *Culicoides nubeculosus* se není schopna vyvíjet *L. major* ani *L. infantum*. Názorně jsme demonstrovali, že mikroskopie zůstává i nadále zásadní metodou pro posuzování vektorové kompetence daného krevsajícího přenašeče.

Ve druhé studii byly porovnávány případné odlišnosti v biologii, životním cyklu a vektorové kompetenci dvou kolonií *P. orientalis* pocházejících z Etiopie. Přestože molekulární metody neodhalily žádné genetické odlišnosti, pozorovali jsme markantní rozdíly v biologii a životním cyklu těchto dvou kolonií. Experimentální infekce prokázaly, že druh *P. orientalis* je velice náchylný k infekci parazity *L. donovani* a že i nejmenší použitá infekční dávka (odpovídající 1–2 promastigotům) je schopna vyvolat infekci přibližně u 50% samic.

V dalších pokusech bylo prokázáno, že *Sergentomyia schwetzi* považovaná v některých oblastech za možného přenašeče lidské leishmaniózy, není vnímavá k infekci *L. major*, *L. infantum* a *L. donovani*. Bylo pozorováno, že zásadním kritériem omezujícím vývoj leishmanie v tomto přenašeči je doba mezi degradací peritrofické matrix a defekací flebotoma. Přetrvávání peritrofické matrix do konce trávicího procesu vede k vypuzení parazitů ze střeva flebotoma spolu s nestrávenými zbytky krve.

Znalost přirozené infekční dávky je nutná k tomu, aby mohl být navržen ideální experimentální model pro viscerální leishmaniózu, který co nejvíce napodobuje přirozené podmínky. Proto jsme kvantifikovali množství promastigotů *L. infantum* přenesených do kůže myši během sání flebotomů, *P. perniciosus* a *L. longipalpis*. Prokázali jsme, že 15%–65% sajících samic je schopno přenést infekci do hostitele a že množství přenesených parazitů je velmi heterogenní v rozmezí od 4 do $4,2 \times 10^4$. Překvapivě nejvíce parazitů přenesly u obou druhů flebotomů samice infikované dermatotropní variantou *L. infantum*; 29% samic *L. longipalpis* a 14% samic *P. perniciosus* přeneslo více než 1000 parazitů.

V poslední části jsme se zabývali významem enzymu nikotinamidázy u leishmanií a její funkcí během vývoje ve flebotomech. Mutantní linie *L. infantum* s knock-outovaným genem pro nikotinamidázu se nebyly schopny ve flebotomech vyvíjet do pozdějších stádií, čímž jsme prokázali nezastupitelnou důležitost tohoto enzymu pro vývoj leishmanie v přenašeči.

1 Úvod

Viscerální leishmanióza (VL) patří mezi velmi důležitá protozoární onemocnění působená prvoky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) z komplexu *L. donovani* a přenášené flebotomy. Nejvíce postižené oblasti leží ve východní Africe v Etiopii, kde se počet nově hlášených případů VL ročně pohybuje kolem 4,5 až 5 tisíc. V Etiopii je to toto onemocnění velmi často asociováno s infekcí virem HIV, což vede k velké mortalitě a morbiditě. Vše je ještě zhoršeno podvýživou místních obyvatel, vzdáleností endemických míst od zdravotních zařízení, nedostupností léků či častou rezistencí leishmanií k léčivům (shrnutí v Cruz et al., 2006; Alvar et al., 2008). Hlavním vektorem uplatňujícím se ohniscích VL v Etiopii je *P. orientalis* (Gebre-Michael et al., 2007), ale někteří autoři hypotetizují o možnosti přenosu leishmaniózy druhem *Sergentomyia*, zejména oblastech, kde *P. orientalis* není tak hojný či zcela chybí (Hoogstraal and Heyneman, 1969).

Detailní studie zabývající se vektorovou kompetencí flebotomů ale i dalších krevsajících členovců jako jsou blechy, klíšťata (Coutinho and Linardi, 2007; Ferreira et al., 2009; Paz et al., 2010; Colombo et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2012) nebo tiplicí (Dougall et al., 2011), jsou velmi důležitým předpokladem pro pochopení přenosových cyklů uplatňujících se přímo v endemických oblastech. Aby mohla leishmanie podstoupit ve vektorovi celý svůj životní cyklus, je nutné, aby byla schopna překonat během tohoto vývoje několik kritických momentů (shrnutí v Sacks and Kamhawi, 2001). Leishmanie se musí umět vyrovnat s účinkem proteolytických enzymů ve střevě flebotoma (Dillon and Lane, 1993), musí včas uniknout z peritrofické matrix a přichytit se pomocí bičků k střevnímu epitelu a zabránit tak svému vypuzení ze střeva flebotoma během defekace spolu s nestrávenými krevními zbytky (shrnutí v Bates, 2008). Budoucnost kontroly a vývoje účinných opatření je závislá právě na znalosti těchto faktorů ovlivňujících vývoj parazita a právě takové studie jsou nepostradatelné pro porozumění epidemiologii leishmanióz. Stejně tak odchyt, kolonizace a chov flebotomů, kteří pocházejí z endemických oblastí, přináší unikátní možnost, jak sledovat biologii a chování těchto vektorů (Volf and Volfova, 2011).

Leishmanie se během svého vývoje ve střevě přenašeče musí vyrovnat také s omezeným množstvím nutričních zdrojů. Je známo, že leishmanie jsou organismy auxotrofní pro NAD⁺ a spoléhají tedy na přísun jeho prekurzorů jako je kyselina nikotinová (Nac) a nikotinamid (NAm) z vnějšího prostředí (Bieganowski and Brenner, 2004). Nikotinamid je přeměňován na kyselinu nikotinovou v reakci katalyzované enzymem nikotinamidázou, která se vyskytuje u nižších organismů, jako jsou bakterie a kvasinky, a zcela chybí u savců. Tento enzym přímo reguluje také růstový potenciál a patogenezi nejrůznějších patogenů (Purser et al., 2003; Kim et al., 2004; Ma et al., 2009) včetně leishmanií (Gazanion et al., 2011). Tyto vlastnosti společně se skutečností, že se nikotinamidáza nevyskytuje u savců z ní dělá velmi slibný potencionální cíl pro účinek léčiv (Michels and Avilán, 2011). Nic není známo o funkci nikotinamidázy leishmanií během vývoje ve flebotomech.

Znalost podrobných interakcí uplatňujících se ve vztahu leishmanií a flebotomů je

nezbytnou podmínkou i při navrhování vhodných modelů pro viscerální leishmaniózu, na kterých by se dala testovat např. nová léčiva. Byly používány různé metody zjišťování počtu parazitů přenesených do kůže hostitele během sání (Warburg and Schlein, 1986; Rogers et al., 2004, 2010; Kimblin et al., 2008; Secundino et al., 2012) a mnoho možností, jak parazity do hostitele inokulovat (shrnutí v Garg and Dube, 2006), přesto není jasné, jaký způsob nejlépe odráží přirozený přenos. Během sání jsou do kůže hostitele vpraveny spolu s parazity farmakologicky aktivní sliny flebotoma (shrnutí v Rohousová and Volf, 2006) spolu se sekrečním gelem promastigotů (Rogers et al., 2002). Obě tyto složky mají přímý pozitivní vliv na vývoj infekce. Neméně důležitou složkou jsou pak samotní parazité a to zejména jejich počet, což je jeden z nejdůležitějších aspektů, na který je nutné se při sestavování modelu pro viscerální leishmaniózu zaměřit.

2 Cíle práce

Tato práce se zabývá různými aspekty, které se týkají vztahu mezi parazity z komplexu *L. donovani* a jejich přenašeči. Testovala jsem vnímavost různých druhů flebotomů a tiplíků k leishmaniové infekci a určovala jsem přesné množství promastigotů injikovaných do místa sání flebotomem nakaženým *L. infantum*. Dále jsem zjišťovala jakou úlohu má aktivita enzymu nikotinamidázy leishmanií pro vývoj v přenašečích.

Hlavními cíly bylo:

- určit přesné množství parazitů injikovaných do kůže myši během sání jednotlivých flebotomů, *Phlebotomus perniciosus* a *L. longipalpis*, nakažených *L. infantum* a porovnat případné odlišnosti u flebotomů nakažených dermatotropním či viscerotropním kmenem
- popsat rozdílnosti v životním cyklu dvou kolonií *P. orientalis* pocházejících z Etiopie, otestovat jejich náchylnost k infekci *L. donovani* a určit vliv počáteční infekční dávky na vývoj leishmanií
- otestovat náchylnost druhu flebotoma *Sergentomyia schwetzi* k leishmaniové infekci
- zjistit vnímavost tiplíků *Culicoides nubeculosus* k různým leishmaniím
- určit úlohu enzymu nikotinamidázy *L. infantum* během vývoje ve svém přirozeném přenašeči, *P. perniciosus*

3 Metodika

Použitá metodika je v detailu popsána v příložených publikacích a může být shrnuta následovně:

- metody běžně používané během kolonizace a chovu kolonií flebotomů (shrnuté v publikaci Volf and Volfova, 2011)
- kultivace leishmanií a experimentální infekce flebotomů
- světelná mikroskopie
- kvantitativní PCR s použitím SYBR fluorescenčních prób
- RAPD PCR a fylogenetické analýzy
- DNA sekvenování

4 Seznam publikovaných článků

1. Maia C, **Seblova V**, Sadlova J, Votypka J, Volf P. (2011). Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(6): e1181. PMID: 21695108
2. **Seblova V**, Volfova V, Dvorak V, Pruzinova K, Votypka J, Kassahun A, Gebre-Michael T, Hailu A, Warburg A, Volf P. (2013). *Phlebotomus orientalis* sand flies from two distant Ethiopian localities and their susceptibility to *L. donovani*. Manuscript submitted to *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
3. Sadlova J, Dvorak V, **Seblova V**, Warburg A, Votypka J, Volf P. (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to human. Manuscript submitted to *Parasites & Vectors*.
4. **Seblova V**, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. (2012). Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *Journal of Medical Entomology* 49(5): 967–970. PMID: 23025175
5. Gazanion E, **Seblova V**, Votypka J, Vergnes B, Garcia D, Volf P, Sereno D. (2012). *Leishmania infantum* nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus*. *International Journal of Parasitology* 42(4): 323–7. PMID: 22619752

5 Shrnutí

Tato dizertační práce shrnuje výsledky projektu, na kterém jsem se podílela během svého postgraduálního studia. Projekty byly zaměřeny na vývoj leishmanií z komplexu *L. donovani* v různých přenašečích. Důraz byl kladen na parametry přenosu a vektorovou kompetenci flebotomů a tiplíků. Dále byla studována důležitost enzymu nikotinamidázy pro vývoj leishmanií ve flebotomech.

- V první části jsme se zaměřili na výzkum různých parametrů přenosu infekce u dvou druhů flebotomů, *P. perniciosus* a *L. longipalpis*, infikovaných dermatotropním nebo viscerotropním kmenem *L. infantum*. Pozorovali jsme, že oba kmeny se vyvíjely v obou přenašečích velmi dobře a promastigoti kolonizovali stomodeální valvu flebotoma. Kvantitativní PCR prokázala, že množství přenesených parazitů je velmi heterogenní v rozmezí od 4 do $4,2 \times 10^4$ a že 15–65% samic je schopno infekci přenést na hostitele v závislosti na použitém kmeni a druhu flebotoma. Nejvíce parazitů přenesly u obou druhů flebotomů samice infikované dermatotropní variantou *L. infantum*, které v 29% a 14% přenesly více než 1000 parazitů. Naopak samice infikované viscerotropní variantou *L. infantum* přenášely méně než 600 parazitů. Významné odlišnosti v přenosu samicemi infikovanými dermatotropní nebo viscerotropní variantou *L. infantum* poukazují, že infekční dávka injikovaná do kůže hostitele by mohla být jeden z faktorů ovlivňující nástup infekce a její výsledný tropismus.
- V druhé studii jsme sledovali životní cyklus, genetické odlišnosti a náchylnost k infekci *L. donovani* u dvou kolonií *P. orientalis* pocházejících z Etiopie: z neendemické části v nížině - Melka Werer (MW) a endemické oblasti na vysočině - Addis Zemen (AZ). Během kolonizace těchto flebotomů jsme pozorovali jejich vysoké nároky na vlhkost a jako kritický faktor ovlivňující vývoj larev se ukázala kvalita krmení. Flebotomové držení na autoklávovaném krmení prokazovali známky nesynchronizovaného vývoje s tendencí larev 4. stádia k diapauzování. Použitím RAPD PCR a sekvenování jsme prokázali, že se obě kolonie neliší na genetické úrovni. Část práce zabývající se křížením obou kolonií prokázala, že se jedinci MW a AZ kolonie mohou mezi sebou křížit a produkovat potomstvo s velmi vysokou fekunditou. Vývoj *L. donovani* v těchto přenašečích byl velmi úspěšný; parazité kolonizovali přední část trávicího traktu flebotoma a stomodeální valvu. Vývoj leishmanií byl při 26 degreeCelsius velmi rychlý a metacykličtí promastigoti byli u většiny samic pozorováni na stomodeální valvě již pátý den po infekci. U obou kolonií se nakazilo vysoké procento samic (93% pro MW a 81% pro AZ) a Q-PCR prokázala, že se finální množství parazitů ve střevě flebotomů těchto dvou kolonií neliší. Ukázali jsme, že i nejmenší použitá infekční dávka (2×10^3 promastigotů/ml krve odpovídající 1–2 promastigotům) je schopna vyvolat silnou nákazu u 50% samic. Naše výsledky napovídají, že to, že se v oblasti Melka Werer viscerální leishmanióza nevyskytuje, není zapříčiněno nízkou náchylností flebotomů z této oblasti k infekci *L. donovani*.

- Dále jsme testovali náchylnost flebotomů *Sergentomyia schwetzi* pocházejících rovněž z Etiopie a to z oblasti Sheraro, ke třem druhům leishmanií, *L. major*, *L. infantum* a *L. donovani*. Během časně fáze infekce, kdy byly leishmanie uzavřeny uvnitř endoperitrofického prostoru, byly nákazy velmi silné a porovnatelné s kontrolními skupinami. Během dalších dní po infekci (PI) *L. donovani* procento nakažených samic prudce klesalo na 28% třetí den PI, 19% čtvrtý den PI a na 1,4% devátý den po infekci. Stejný klesající trend byl pozorován i u samic nakažených *L. major* a *L. infantum*. Pouze jediná samice infikovaná *L. donovani* byla pozitivní devátý den PI a promastigoti byli lokalizováni ve střední části střeva. Žádné infikované samice nebyly pozorované devátý den PI u nákaz provedených leishmaniami *L. major* a *L. infantum*. Prokázali jsme, že pro vývoj lidských leishmanií v přenašeči *S. schwetzi* je kritickým momentem doba mezi rozpadem peritrofické matrix a defekací flebotoma. Ve flebotomech *S. schwetzi* byl totiž rozpad peritrofické matrix zpožděný až do doby defekace a promastigoti neměli šanci uniknout z endoperitrofického prostoru a přichytit se bičíky k epitelu střeva, což vedlo k vypuzení parazitů ze střeva během defekace spolu s nestrávenými zbytky. Z výše uvedených výsledků je patrné, že flebotomus *S. schwetzi* se neuplatňuje jako přenašeč lidských leishmanióz v severní Etiopii.
- Dále byla testována náchylnost tiplíků *Culicoides nubeculosus* k infekci *L. major* a *L. infantum*. Oba testované druhy leishmanií se vyvíjely velmi intenzivně do třetího dne po infekci, avšak po defekaci se infekce zcela vytratila. U 17% samic byly slabé infekce pozorovány v abdominální části střeva ještě 4.–5. den PI, ale sedmý a desátý den bylo všech 70 vyšetřovaných samic negativních. Ukázali jsme tedy, že leishmanie není schopna kompletního vývoje v tiplících *C. nubeculosus*, neboť promastigoti nejsou schopni uniknout z peritrofické matrix a přichytit se ke střevu před defekací. Předpokládáme, že právě ona neschopnost promastigotů přichytit se včas ke střevnímu epitelu je hlavním důvodem neschopnosti leishmanií se dále v těchto tiplících vyvíjet a dokončit svůj životní cyklus. Přestože všechny vyšetřené samice ze sedmého dne PI byly negativní, PCR ukázala záchyt DNA leishmanií i v tento den. PCR je metoda velmi senzitivní a pravděpodobně zachytila pouze DNA z mrtvých tělíček leishmanií. Tímto jsme demonstrovali, že pozitivní PCR sama o sobě neříká nic o vektorové kompetenci krevsajících členovců.
- V posledním projektu jsme se zaměřili na důležitost enzymu nikotinamidázy vyskytujícího se u leishmanií během jejího vývoje v přenašečích. Prokázali jsme, že delece genu pro nikotinamidázu vede k neschopnosti mutantů *L. infantum* dokončit vývojový cyklus. Naše výsledky prokazují, že nikotinamidáza a prekurzor nikotinamid (NAm) mají nezastupitelnou roli během vývoje v přenašečích.

References

- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, and Moreno J (2008).** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 21(2):334–359. Review.
- Bates PA (2008).** *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*, 11(4):340–344.
- Bieganowski P and Brenner C (2004).** Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD⁺ in Fungi and Humans. *Cell*, 117(4):495–502.
- Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, and Pereira-Chioccia VL (2011).** Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*, 109(2):267–274.
- Coutinho MTZ and Linardi PM (2007).** Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol*, 147(3):320–325.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, and Alvar J (2006).** *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 123:357–388. Review.
- Dillon RJ and Lane RP (1993).** Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med Vet Entomol*, 7(3):225–232.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, and Walton SF (2011).** Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*, 41(5):571–579.
- Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, and Lima VMF (2009).** Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, 165(1):150–154.
- Garg R and Dube A (2006).** Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123(3):439–454. Review.
- Gazanion E, Garcia D, Silvestre R, Gérard C, Guichou J, Labesse G, Seveno M, Cordeiro-Da-Silva A, Ouaisi A, Sereno D, and Vergnes B (2011).** The *Leishmania* nicotinamidase is essential for NAD⁺ production and parasite proliferation. *Mol Microbiol*, 82(1):21–38.
- Gebre-Michael T, Balkew M, Alamirew T, Gudeta N, and Reta M (2007).** Preliminary entomological observations in a highland area of Amhara region, northern Ethiopia, with epidemic visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 101(4):367–370.

- Hoogstraal H and Heyneman D (1969).** Leishmaniasis in Sudan Republic. 30. Final epidemiologic report. *Am J Trop Med Hyg*, 18:1091–1210.
- Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, Makino Si, Shirahata T, and Watarai M (2004).** *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. *FEMS Microbiol Lett*, 234(2):289–295.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, and Sacks D (2008).** Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(29):10125–10130.
- Ma B, Pan SJ, Domergue R, Rigby T, Whiteway M, Johnson D, and Cormack BP (2009).** High-affinity transporters for NAD⁺ precursors in *Candida glabrata* are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation. *Mol Cell Biol*, 29(15):4067–4079.
- Michels PA and Avilán L (2011).** The NAD⁺ metabolism of *Leishmania*, notably the enzyme nicotinamidase involved in NAD⁺ salvage, offers prospects for development of anti-parasite chemotherapy. *Mol Microbiol*, 82(1):4–8.
- Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky ÉM, da Rocha Lima ACVM, França-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, and Dias ES (2010).** Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 106(2):523–528.
- Purser JE, Lawrenz MB, Caimano MJ, Howell JK, Radolf JD, and Norris SJ (2003).** A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. *Mol Microbiol*, 48(3):753–764.
- Rogers ME, Chance ML, and Bates PA (2002).** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol*, 124(5):495–507.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, and Bates PA (2004).** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430(6998):463–467.
- Rogers ME, Corware K, Müller I, and Bates PA (2010).** *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. *Microbes Infect*, 12(11):875–879.
- Rohousová I and Volf P (2006).** Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol*, 53(3):161–171. Review.
- Sacks D and Kamhawi S (2001).** Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55:453–483. Review.

- Secundino NF, de Freitas VC, Monteiro CC, Pires ACA, David BA, and Pimenta PF (2012).** The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. *Parasites & Vectors*, 5:20.
- Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, and Trotta M (2012).** Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 5:98.
- Volf P and Volfova V (2011).** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol*, 36:S1–S9.
- Warburg A and Schlein Y (1986).** The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*, 35(5):926–930.

Veronika Hrobáriková
(roz. Šeblová)

Curriculum vitae

Department of Parasitology
Faculty of Science
Viničná 7
128 44, Prague 2
Czech Republic
☎ +420 221 951 814
✉ vera_vera@seznam.cz

Education

- 2008–present **Postgraduate study**, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague.
Thesis: Development of *Leishmania* from *L. donovani* complex in various vectors
- 2006–2008 **MSc. in Parasitology**, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague.
Theme: Host feeding preferences of WNV vectors in Czech Republic and vectors of *Leishmania* in Turkey
- 2003–2006 **BSc. in Biology**, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague.
Theme: Host feeding preferences of WNV vectors in Czech Republic

Practice

- 2008–present **research worker**, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague.
- 2004–2008 **laboratory technician**, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague.
- Teaching activity
- 2012–present Exercise of the Foundations of Parasitology

Research team member

- 2009–2012 Czech Science Foundation (Grant No. 206/09/0777): Visceral versus cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*: effect of the vector (principal investigator: prof. Volf)
- 2009–2012 Czech Science Foundation (Grant No. 206/09/H026): Parasite-host relationships and evolution of parasitism (principal investigator: prof. Scholz)

- 2011–present Grant Agency of Charles University (Grant No. 42611/2011) Development of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in sand flies and mice (principal investigator: Mgr. Veronika Hrobáriková (Šeblová))
- 2011–present International Grant EDENext - Biology and control of vector-borne infections in Europe (European Commission, 2011-2014)
- 2013–present Czech Science Foundation (Grant No.13-07500S): Development of *L. donovani* in insect vectors: factors affecting vector competence of sand flies and sex of *Leishmania* parasites (principal investigator – RNDr. Sádlová PhD.)

Publications

- 2008 Votýpka J., Šeblová V., Rádrová J. (2008). Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *J Vector Ecol* 33 (2): 269–277
- 2009 Svobodová M., Bulent A., Zídková L., Dvořák V., Hlavačková J., Myšková J., Šeblová V., Kasap O., Belen A., Votýpka J., Volf P. (2009). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 39: 251–256.
- 2010 Svárovská A., Ant T., Šeblová V., Ječná L., Beverly S., Volf P. (2010). *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2⁻) but not lipophosphoglycan (lpg1⁻) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (1): e580.
- 2011 Sádlová J., Yeo M., Šeblová V., Lewis MD, Mauricio I, Volf P, Miles MA. (2011). Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One* 6(5): e19851.
- Maia C, Šeblová V., Sádlová J, Votýpka J, Volf P. (2011) Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6): e1181.
- 2012 Gazanion E., Šeblová V., Votýpka J., Vergenes B., Garcia D., Volf P., Sereno D. (2012). *Leishmania infantum* nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus*. *Int J Parasitol* 42(4): 323–327.
- Šeblová V., Sádlová J., Carpenter S., Volf P. (2012) Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implication for screening vector competence. *J Med Entomol* 49 (5): 967–970.

Chajbullinova A., Votýpka J., Sádlová J., Kvapilová K., Šeblová V., Kreisinger J., Jirku M., Sanjoba C., Gantuya S., Matsunoto Y., Volf P. (2012). The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasites & Vectors* 5: 219.

- 2013 Šeblová V., Volfova V., Dvořák V., Pružinová K., Votýpka J., Kasahun A., Gebre-Michael T., Hailu A., Warburg A. and Volf P. (2013). *Phlebotomus orientalis* sand flies from two distant Ethiopian localities and their susceptibility to *L. donovani*. Submitted to *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Sádlova J., Dvořák V., Šeblová V., Warburg A., Votýpka J., Volf P. (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to human. Submitted to *Parasites & Vectors*.

Ječná L., Dostálová A., Wilson R., Šeblová V., Chang KP., Bates PA., Volf P. (2013). The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. Submitted to *Parasitology*.

Conference presentations

- EDEN 2010 Šeblová V., Votýpka J., Alten B., Volf P. (2010) Susceptibility of sand-fly vectors for *Leishmania donovani* strains emerging in the Mediterranean, International conference EDEN 2010, France, Montpellier, 10–12th March 2010; poster
- Svárovská A., Ječná L., Šeblová V., Beverly S., Volf P. (2010) Lipophosphoglycan-independent attachment of *Leishmania* in permissive vectors, International conference EDEN 2010, France, Montpellier, 10–12th March 2010; poster
- ICOPA 2010 Šeblová V., Votýpka J., Maia C., Svobodová M., Volf P., (2010) *Leishmania donovani* emerging in Turkey: experimental infections of sand flies and mice, International Congress of Parasitology ICOPA XII, Australia, Melbourne, 15–20th August 2010; poster
- Maia C., Šeblová V., Sádlová J., Votýpka J., Volf P. (2010) New transmission model for *Leishmania infantum* using single bite of *Phlebotomus perniciosus*, International Congress of Parasitology ICOPA XII, Australia, Melbourne, 15–20th August 2010; oral presentation
- ISOPS 2011 Šeblová V., Sádlova J., Votýpka J., Svobodová M., Volf P. (2011) Different isolates of *Leishmania donovani* complex: development in the sand fly vectors and the evidence of genetic exchange, 7th International Symposium on Phlebotomine sandflies, 25–30th April 2011, Turkey, Kusadasi; oral presentation

Maia C., Šeblová V., Sádlová J., Votýpka J., Volf P. (2011) Experimental transmission of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermotropic strains by two major vectors, 7th International Symposium on Phlebotomine sandflies, 25–30th April 2011, Turkey, Kusadasi; oral presentation

Votýpka J., Dvořák V., Volfová V., Sádlová J., Rohoušová I., Šeblová V., Kassahun A., Gebre-Michael T., Hailu A., Warburg A., Volf P. (2011) Molecular taxonomy and colonisation of potential visceral leishmaniasis vectors in Ethiopia, 7th International Symposium on Phlebotomine sandflies, 25–30th April 2011, Turkey, Kusadasi; poster

EDENext 2012 Šeblová V., Gazanion E., Sereno D., Carpenter S., Sádlová J., Votýpka J., and Volf P. (2012) Development of *Leishmania infantum* in vectors, EDENext 2012, Turkey, Izmir, 25–30th March 2012; oral presentation

E-SOVE 2012 Šeblová V., Sádlová J., Hlaváčová J., Carpenter S., and Volf P. (2012) Development of various strains of *Leishmania donovani* complex in sand flies and biting midges, 18th International conference E-SOVE 2012, France, Montpellier, 8–11th October 2012; oral presentation

Reviewers

Prof. Luigi Gradoni

Instituto Superiore di Sanita, Unit of Vector Borne Diseases & International Health,
MIPI Department, Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy

Prof. Bulent Alten

Hacettepe University (HU ESRL), Faculty of Science Biology, Department of Ecology,
Beytepe, Ankara, Turkey